

この孵化酵素(Lot 9)の力価について：

この孵化酵素(Lot 9)は、原液で、ヤスリがけした卵に用いた場合、15-25分で卵膜内層を消化しました。（下の表を参照）。

孵化酵素は卵膜の内層を消化しますが最外層を消化しません。その為、紙ヤスリで卵膜表面を削っておくと、外部から与えた孵化酵素が内層に届き易くなり処理時間を短く出来ます。また、紙ヤスリで卵表面を削っておいた場合には、初期胚でも孵化酵素を効かせるだけで卵膜外層に覆われていない裸卵を得ることが出来ます。

表：卵膜内層の完全消化までにかかった時間

	孵化酵素溶液の希釈倍率		
	1/1	1/3	1/6
ヤスリがけした卵	15-25分	45-75分	90分以上
ヤスリがけしていない卵	3.5時間以上		

力価の評価の方法：

後期胞胚～初期囊胚 (1 dpf)を各処理群当たり10個、孵化酵素溶液100 μ L、27°Cの条件で24穴プレートを用いて処理を行った。孵化酵素溶液の希釈には、岩松のメダカ生理食塩水(BSS: Iwamatsu's Balanced Salt Solution) pH 約8.0を用いた。

孵化酵素を作製した方法について：

この孵化酵素液は、ヒメダカの卵を孵化直前まで育て、Hatching Solution (10 mM NaCl, 2 mM NaHCO₃) 中で高密度・短時間で孵化させた上澄み溶液です。0.2 μ mセルロースアセテートフィルターを用いて濾過したものを分注し、液体窒素で凍結後、-80°Cで保存しました。チューブ 1本あたり200 μ L の溶液が入っています。

孵化酵素液の作成法は主にWeb版「Medaka Book」6.1章 "Preparation of medaka hatching enzyme. Wakamatsu, Y." (<http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/medakabook/>) に従っています。

孵化酵素の使い方の一例：

1. 胚をBSSで一度洗う。発生後期の胚にはこの操作は不要。
2. 胚の周辺の水をピペットマンで取り除く。
3. 孵化酵素溶液を胚が完全に浸かるくらいに入れる。
 - ・ 孵化酵素溶液の希釈には、初期胚にはBSS (約pH8.0)を用いる。
 - ・ 囊胚期以前の胚は壊れ易いので、胚を重ねて入れ過ぎない様に気をつける。およそ2個分以上の胚が縦に重ならない方が良い（上の胚の重みで下の胚が潰れてしまう）。
4. 27°Cで静置。卵膜内層の消化の進み具合を実体顕微鏡下で観察する。
5. 卵膜内層が消化されたら、孵化酵素液をピペットマンで回収する。
 - ・ ぎりぎりまで溶液を回収すると、初期胚は壊れてしまうので注意する。
 - ・ 回収した孵化酵素液は再利用出来る。遠心により、ゴミ等を取り除くと良い。4°Cか氷上に保存する。再凍結・解凍により活性は落ちるが再凍結による保存も可能。
6. BSSを胚に注いで胚を回収する。胚を何度かBSSで洗っても良い。
7. ヤスリがけをしていない胚を用いた場合は、溶け残った卵膜外層をピンセットやピペッティングにより取り除く。

耐水性紙ヤスリを用いた卵膜表面の削り方:

(Wiley-Blackwell 社より2009年に出版された"Medaka - Biology, Management, and Experimental Protocols"中の"Movie6-3" [Kinoshita, M.] <https://medaka-book.org/contents/chapter06/m06-03.html> を参考にして下さい。)

1. 耐水性紙ヤスリ（粒度：1200-1500 番）を丸く切って、6～10 cm 培養皿の蓋の内側に両面テープで貼付ける。
2. 実験用ラテックス手袋を着けておくと良い（ヤスリによって指紋が削れないので）。手袋の指だけを切り取って、人差し指だけにはめておくと良い。
3. 紙ヤスリの上に卵をピペットで移し、適度に水を抜く。水を抜きすぎると、ヤスリをかけている際に卵がはね飛んでしまう。水が多すぎると、卵に浮力が生じてヤスリがかけにくい。
4. 指先で卵を押さえながら紙ヤスリの上で転がして卵表面を削る。削りすぎると卵が壊れるので、時々顕微鏡で一部の卵を観察する。付着糸が全て無くなるまで削れば十分。（発生後期の胚の場合は、ヤスリがけがいい加減でも良い。発生後期の胚は、体が真直ぐに伸びようとする力が働くので、卵膜が内側から破れ易い。）
5. 卵を培養皿に戻す。ピペットで卵を吸い上げるか、もしくは、先の曲がったピンセット(No.16)で卵を挟み上げる。

注：

- ・ 産卵直後で卵膜が硬化する前の卵は押しつぶされ易いので、ヤスリがけはできません。
- ・ ヤスリをかけた卵も問題なく発生するので、孵化酵素処理前のどの段階でヤスリをかけておいても良いです。ただし、裸卵は細菌やカビにより腐敗し易いので注意して下さい。
- ・ 耐水性ペーパーが削れて生じる黒い粒子が胚発生を邪魔することはこれまでにないです。この粒子が胚の観察の邪魔になる際には洗い流して下さい。

2021年8月
基礎生物学研究所 バイオリソース研究室